

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 21620111152404

UDC _____

廈門大學

碩 士 学 位 论 文

与老年性痴呆相关基因 TREM2 的转录调控
研究

Transcriptional Regulation of TREM2 in Alzheimer's
Disease

牟鹏飞

指导教师姓名: 陈小芬

专 业 名 称: 微 生 物 学

论文提交日期: 2014 年 4 月 15 日

论文答辩时间: 2014 年 5 月 日

学位授予日期: 2014 年 月

答辩委员会主席：_____
评 阅 人：_____

2014 年 5 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):
年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学博硕士论文摘要库

摘 要

作为衰老过程中一个重要的特点，神经炎症与多种神经退行性疾病密切相关，特别是老年痴呆症(Alzheimer's Disease, AD)。TREM2(Triggering receptor expressed on myeloid cells 2)是最近通过全基因组关联研究 (Genome-Wide Association Studies, GWAS) 鉴定出的 AD 风险基因。研究表明：TREM2 在脑内主要参与小胶质细胞对凋亡神经元等的内吞作用，同时抑制脑内炎症反应的扩大。大量的人群基因测序显示 TREM2 基因突变与多种神经退行性疾病存在相关性，提示可能是 TREM2 功能异常导致脑内炎症稳态失调，进而引起神经退行性疾病的发生。而 TREM2 的转录调控异常极有可能参与这些神经炎症密切相关的神经退行性疾病的发生与发展中。

本研究主要侧重于 TREM2 基因转录水平调控研究，我们发现：细菌脂多糖 (Lipopolysaccharides, LPS) 和 β -淀粉样蛋白 (β -amyloid, A β) 刺激均可以导致 TREM2 的 mRNA 水平显著下降；而 NF- κ B 的抑制剂处理则可以逆转 LPS 处理引起的 TREM2 表达的下调。我们通过序列分析、点突变以及荧光素酶活性分析鉴定了该基因转录活性所必需的最小启动子区以及位于 TREM2 启动子区上的 NF- κ B 结合位点。此外，我们进行了针对 TREM2 靶基因的小分子化合物的筛选工作，为接下来在 AD 小鼠模型上验证药物的作用打下了基础。最后，我们对脑组织中 TREM2 的细胞特异表达进行了探索，并发现 DNA 甲基化修饰可能参与了 TREM2 基因的细胞特异性表达调控，暗示表观遗传修饰可能与 AD 发病存在联系。

总之，我们发现了一些引起 TREM2 转录下调的病理因素，并初步证明了 NF- κ B 这一转录因子对 TREM2 的转录调控作用，筛选了能够特异诱导 TREM2 表达的小分子化合物，为下一步深入探讨 TREM2 的转录调控打下坚实基础，同时也为 AD 治疗提供了新的思路。

关键词： TREM2；A β ；转录调控；NF- κ B；细菌脂多糖

Abstract

As a major characteristic of the aging process, neuroinflammation is involved in the pathogenesis of several aging-related diseases including Alzheimer's disease (AD). Triggering receptor expressed on myeloid cells 2 (TREM2) is a newly identified risk gene for AD. TREM2, as an innate immune receptor expressed on the cell membrane, is mainly expressed in immature dendritic cells, osteoclasts, tissue macrophages, and microglia. However, it remains largely unknown how TREM2 expression is regulated in different cell-types, such as microglia.

Here, we demonstrated that LPS and A β treatment could down-regulate the mRNA level of TREM2 in microglia, while NF- κ B inhibitors can reverse this effect. Furthermore, we characterized upstream regions of the mouse TREM2 gene, by sequence analysis and the point mutation technology. We identified a potential NF- κ B binding site important for the promoter activity through the luciferase activity analysis. We also screened for small molecular compounds that could modulate TREM2 expression with our home-made library. Furthermore, we explored the cell-specific expression of TREM2 in mouse brain tissue and discovered that DNA methylation may be important for TREM2 expression.

In summary, we discovered inflammatory cues, such as LPS and A β , could down-regulate the expression level of TREM2. NF- κ B appears to be the transcription factor that mediates this effect as NF- κ B inhibitors could restore TREM2 expression level. In addition, we mapped out the potential binding site for NF- κ B on TREM2 promoter and found its mutation could enhance TREM2 expression. Furthermore, we found TREM2 exhibits cell-type specific expression and small molecular compounds could modulate TREM2 expression. All these findings improved our understanding about the transcription regulation of TREM2 gene, meanwhile, provided new thought for the treatment of AD.

Key words: TREM2; A β ; Transcriptional regulation; NF- κ B; LPS

目录

第一章 前言	1
1 老年性痴呆症	1
1.1 概述	1
1.2 AD 的主要病理特征	1
1.3 神经纤维缠结 (neurofibrillary tangles, NFT)	2
1.4 淀粉样斑 (amyloid plaques)	2
2 TREM 受体家族基因组, 结构和信号转导	3
2.1 TREM 受体家族	3
2.3 可溶性 TREMs	4
2.4 TREM2 的生物学功能	5
2.5 TREM2 基因的转录调控	8
2.6 TREM2 的配体	8
2.7 其他 TREM 家族成员	9
3 炎症与老年性痴呆	10
4 本论文的研究内容与研究意义	9
第二章 材料与方法	13
1 材料	13
1.1 细胞株及菌种	13
1.2 质粒和载体	13
1.3 培养基	13
1.4 琼脂糖凝胶	14
1.5 免疫印迹 (Western blot) 所需试剂	14
1.6 其它所需试剂和材料	15
2 主要仪器	15
3 实验方法	17
3.1 细胞培养	17
3.2 原代小胶质细胞、星形胶质细胞分离培养	17
3.3 质粒提取	19

3.4 蛋白样品的制备	19
3.5 Tricine 凝胶电泳	20
3.6 抗原抗体反应	21
3.7 ECL 显色	21
3.8 RNA 水平检测	22
3.9 TurboFect 试剂转染法	23
3.10 生物信息学分析	23
3.11 荧光素酶活性分析	24
第三章 实验结果与分析	27
1.TREM2 基因启动子的克隆与功能性分析	27
2.TREM2 启动子的生物信息学预测分析	28
3 炎症反应导致 TREM2 表达下调	29
4 TREM2 启动子上转录因子结合位点的鉴定	30
5. NF- κ B 抑制剂能够逆转 LPS 引起的 TREM2 的转录下调	32
6.TREM2 基因特异性高表达于小胶质细胞	33
7.DNA 甲基化参与调控 TREM2 细胞类型特异性表达	34
8.TREM2/ApoE 靶基因转录调控药物筛选	35
第四章 讨论与展望	40
参考文献	43
致 谢	51

Table of Contents

Chapter1. Introduction	1
1 Alzheimer's disease	1
1.1 Overview	1
1.2 Major Pathologic Features of AD	1
1.3 Neurofibrillary tangles	2
1.4 Amyloid plaques	2
2 TREM family, structure, signaling transduction	3
2.1 TREM receptor family	3
2.2 Soluble TREMs	6
2.3 Biological Function of TREM2	7
2.4 Transcription Regulation of TREM2	10
2.5 TREM2 Ligand	10
2.6 Other TREMs family members	11
3 Inflammation and Senile Dementia	10
4 Purposes and Contents of This Thesis	12
Chapter2. Materials and Methods	13
1 Materials	13
1.1 Cell Lines and Bacteria	13
1.2 Plasmids	13
1.3 Enzymes and Markers	13
1.4 Sepharose Gel	14
1.5 Western Blot Reagents	14
1.6 Other Reagents and Materials	15
2 Equipment	15
3 Methods	18
3.1 Cell Culture	18
3.2 Isolation and Culture of Primary Microglia and Astrocyte	19
3.3 Plasmids Extraction	19

3.4 Preparation of Protein Sample	20
3.5 Tricine Gel	20
3.6 Antigen-Antibody Reaction	21
3.7 Western Blot	21
3.8 Detection of mRNA	21
3.9 Transient Transfection	23
3.10 Bioinformatics Analysis	23
3.11 Luciferase Activity Analysis	24
Chapter3. Results and Analysis	27
1 Bioinformatic analysis of TREM2 promoter	27
2 Cloning and functional assay of TREM2 promoter	28
3 Inflammation causes downregulation of TREM2	29
4 Identification of transcription factor binding sites	30
5 NF-κB inhibitor block LPS induced downregulation of TREM2	31
6 TREM2 gene is specifically high expressed in microglial cells	33
7 DNA methylation participate in TREM2 cell type specific expression	34
8 TREM2/ApoE targeted drug screening	35
Chapter4. Discussion and Prospect	40
Reference	43

英文缩略词

英文缩写	英文全名	中文名称
AD	Alzheimer's Disease	阿尔茨海默症
A β	β -Amyloid	β -淀粉样蛋白
AKT	receptor serine/threonine kinases	苏氨酸激酶
APP	β -Amyloid Precursor Protein	β -淀粉样前体蛋白
ApoE	Apolipoprotein E	载脂蛋白 E
BACE1	β -site APP Cleaving Enzyme 1	β -位 APP 剪切酶 1
cDNA	Complementary DNA	互补脱氧核糖核酸
CCL2	CC chemokine ligand 2	趋化因子配体 2
DAP12	TYRO protein tyrosine kinase-binding protein	酪氨酸激酶结合蛋白
FAD	Familial AD	家族性 AD
HSP60	The 60 kDa heat shock protein	热休克蛋白 60
ITAMs	immunoreceptor tyrosine-based activation motif	酪氨酸依赖的免疫受体激活基序
IL-1 β	Interleukin-1 β	白介素 1- β
LPS	lipopolysaccharide	脂多糖
MAP	Microtubule-associated Protein	微管相关蛋白
MAPK	Mitogen-activated protein kinase	丝裂原激活的蛋白激酶/MAP 激酶
MCP1	monocyte chemoattractant protein 1	单核细胞趋化蛋白 1
NFT	Neurofibrillar Tangles	神经元纤维缠结
NF-KB	nuclear factor kappa	核转录因子
NKp44	NK cell protein 44	自然杀伤细胞蛋白 44
Nasu-Hakola	PLOSL	多囊性脂膜样骨发育不良并硬化性白质脑病
PBS	Phosphate-buffered saline	磷酸盐缓冲液
PCR	Polymerase Chain Reaction	聚合酶链式反应
PS	Presenilin	早老素

PI3K	Phosphatidyl Inositol 3-kinase	磷脂酰肌醇-3-羟激酶
PHF	paired-helical filament	配对螺旋纤维
SAD	Sporadic AD	散发性 AD
sAPP	Soluble APP N-terminus	可溶性 APP N 端
TCA	Trichloroacetic Acid	三氯乙酸
TLT-1	TREM like transcript-1 Triggering Receptor Expressed on	髓细胞激发受体样转 录因子-1
TREM	Myeloid Cells	髓细胞触发受体表达
TNF α	Tumor Necrosis Factors A	肿瘤坏死因子 α
Th1	T Helper Type 1	辅助 T 淋巴细胞 1 类
IFN- γ	interferon- γ	γ 干扰素
SAD	sporadic AD	散发性 AD
sAPP	soluble amyloid precursor protein	可溶性淀粉样蛋白前 体蛋白
SHP-1	tyrosine phosphatase	酪氨酸磷酸酶
5-Aza	5-Aza-2' -deoxycytidine, 5-Aza-CdR	5-氮杂-2' -脱氧胞苷
NSAIDs	Non-Steroidal Antiinflammatory Drugs	非甾体抗炎药

第一章 前言

1 老年性痴呆症

1.1 概述

老年性痴呆（Alzheimer's disease, 也称阿尔茨海默症, 简称 AD）是一种散发为主的, 与衰老相关的痴呆性疾病。人类大脑有超过 1000 亿的神经元, 它负责向其他细胞传递信息, 是大脑基本工作的组成部分。一般而言, 由于皮层神经元不可再生, 一旦其发生凋亡并表现出临床症状, 则该过程无法逆转。因此, 阿尔茨海默病被划分为进行性神经退行性疾病, 其病程可迁延 5-20 年。该疾病过程中, 患者神经元的凋亡可高达 50%。这些神经元的丢失可导致相应的临床症状。65 岁以上的人群中有大约 10% 的人, 85 岁以上的人群中有约 50% 的人患有此病^[1]。患者的症状主要是: 记忆减退、认识障碍、人格改变等^[2]。在发达国家, AD 成为继心脑血管病、肿瘤和中风之后的第四位死亡原因。随着人口老龄化的进一步发展, AD 已成为现代社会的主要健康问题之一。中国已经步入老龄化社会, 患有 AD 的人口比率将迅速增加。2010 年, 全球用于老年痴呆治疗及护理等总费用高达六千亿美元。未来, AD 患者对我国来说也将会是一项巨大的社会和经济负担。目前还没有治疗 AD 的有效手段, 并且只阐明了部分的 AD 发病病因。因此迫切需要我们深入研究 AD 的致病机理, 探讨各种因子具体如何调控 AD 的发生和发展, 以期能为开发 AD 治疗的高效药物提供有效、合理的药物作用靶点。

1.2 AD 的主要病理特征

老年痴呆症主要有两大病理性特征, 分别为: 胞内由高度磷酸化的微管相关蛋白 (Microtubule-associated protein, Tau) 构成的神经纤维缠结^[3], 和胞外主要由 A β 沉积形成的淀粉样斑 (amyloid plaques)^[4]。这两大病理特征的出现常伴随着星形细胞增生, 神经突触传递减退, 突触可塑性降低, 以及神经元的大量死亡。关于老年痴呆的病因至今还未完全确认, 但多数科学家在两个方面达成共识: 一方面, β -淀粉样蛋白在神经元外积累聚集, 干扰神经元之间的突触信息传递, 并

造成神经元死亡；另一方面，Tau 蛋白在神经元内形成纤维缠结，阻碍细胞内营养物质和重要分子的转运。ApoE 基因的 $\epsilon 4$ 亚型、心血管疾病风险因子、以及脑外伤等都是潜在增加罹患老年痴呆的风险因素^[5; 6]。

1.3 神经纤维缠结 (neurofibrillary tangles, NFT)

配对螺旋纤维 (paired-helical filament, PHF) 是 NFT 的基本单位，即成对的 10nm 相互缠绕而成的螺旋状细丝。而 PHF 主要由过度磷酸化后的微管相关蛋白 tau (microtubule-associated tau) 组成^[7]。Tau 占据微管相关蛋白 (microtubule-associated protein, MAP) 的主要组分, MAP 则与微管蛋白组成形成了细胞骨架的重要成分——微管^[8]。Tau 蛋白是脑细胞特别是神经元中主要的微管相关蛋白，其生理功能是催化微管装配、增加微管的稳定性和细胞骨架的整体性^[9]。Tau 的过度磷酸化使其与微管蛋白的结合只有正常 Tau 蛋白的 1/10 左右，这一病理现象降低了 Tau 蛋白对微管的稳定作用，使得 Tau 变得更容易聚集，形成 PHF 和 NFTs。Tau 蛋白过度磷酸化后不仅与正常微管相关蛋白相互竞争，扰乱微管形成，而且，Tau 蛋白能引起正常微管相关蛋白与微管的分离，促使微管解聚，导致神经元轴突变性，干扰神经递质的合成、运输和释放，破坏神经细胞间正常的物质运输障碍，导致神经退行性病变的发生^[10; 11]。Tau 蛋白功能异常变化是神经元死亡和功能障碍的必经环节，因此，针对 Tau 蛋白的功能和代谢来开发相关药物，对 AD 的治疗是有重大意义的。动物水平和细胞学实验均已表明，单体和寡聚体形式的磷酸化的 tau 存在细胞毒性^[12; 13]。此外，tau 或许参与 β -淀粉样蛋白 (beta amyloid, $A\beta$) 的细胞毒性， $A\beta$ 对 tau 敲除后的细胞不存在毒性^[14]。在 AD 病人中普遍存在 NFT 引起的轴突整体性丧失，进而导致突触之间连接的减弱^[15]。这些研究共同说明，tau 及其聚集体在 AD 的发病中可能发挥着重要作用。

1.4 淀粉样斑 (amyloid plaques)

淀粉样斑，也常常被称为老年斑 (senile plaques)，由 $A\beta$ 、tau 蛋白、载脂蛋白 E 等成分组成^[16]。其中， $A\beta$ 作为其主要成分，在 AD 的发病中发挥重要作用^[17]。 $A\beta$ 具有极强的神经毒性， $A\beta$ 处理神经元或者将 $A\beta$ 直接注入小鼠的大脑都会引起细胞的死亡，因此过度产生的 $A\beta$ 被认为是导致 AD 的发病的重要病因^[18]。此

外，近来的研究表明，寡聚体的可溶性A β 对神经细胞具有更大毒性，并破坏突触可塑性^[19]。以上这些研究表明，A β 的产生、聚集以可能在AD发病中扮演至关重要的作用。

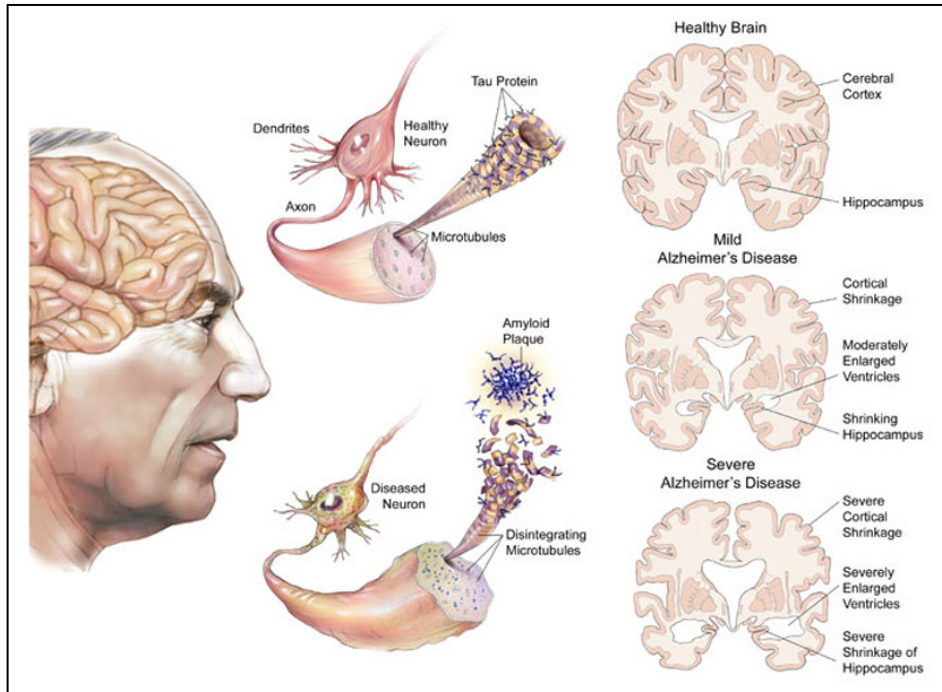


图 1.1 老年痴呆症的两大病理性特征

Figure 1.1 Two major pathologic characteristics of AD

注：摘自 <http://health.mashangel.com/>

2 TREM受体家族的结构和信号转导

2.1 TREM 受体家族

人的TREM基因簇定位在第6号染色体上(6p21.1)，鼠的则位于17号染色体C3区。TREM2基因簇包括编码TREM-1, TREM2, TREM-3的基因，另外还有编码抑制型受体的TREM样(TREM-like)基因，有两个亚型，分别编码TLT-1和TLT-2^[20]。上述所有这些受体都隶属于免疫球蛋白超家族，具有单一的胞外Ig样区。TREMs受体表达于自然免疫细胞表面，在自然免疫及获得性免疫调节中均发挥重要作用。TREM基因簇在基因座上最近的是NKp44，它是由NCR2基因编码的激活自然杀伤细胞的受体。再远一点的TREM基因的“亲属”有CD300家族成员之一的CMRF-35s以及在人类中的IREM受体和在鼠中的CLM类受体^[21; 22]。

人的TREM-1和TREM2都包含一个胞外结构域，一个跨膜结构区，和一个短的胞

内结构域^[23]。跨膜区还有一个强正电基团,起到介导与胞内信号传导分子DAP12形成复合物的作用^[24]。DAP12主要负责将TREM-1、TREM2与TREM3介导的胞外信号传递到胞内。TREM-1, TREM-2和TREM-3和DAP12结合的区域主要包含一个免疫受体酪氨酸活化基序^[25],在膜表面的受体结合配体之后,酪氨酸激酶磷酸化DAP12上的酪氨酸残基^[26],进而形成Syk酶的停泊位点,在与DAP12上磷酸化后的ITAM结合之后, Syk会磷酸化支架分子Lat和NTAL, 招募近端信号分子PI3K(磷脂酰肌醇-3-羟激酶), PLC(γ 磷脂酶C), SLP-76-Vav, Grb2-Sos和c-Cbl^[27]。特异性的下游信号级联反应进一步放大, 结果引起Akt, 蛋白激酶 θ 和MAPK激酶的活化。与TREMs不同的是, trem-like不会与DAP12结合, 它自身胞内结构域含有ITAMs, ITAMs会招募SHP-1和SHP-2这两种磷酸酶^[28; 29]。

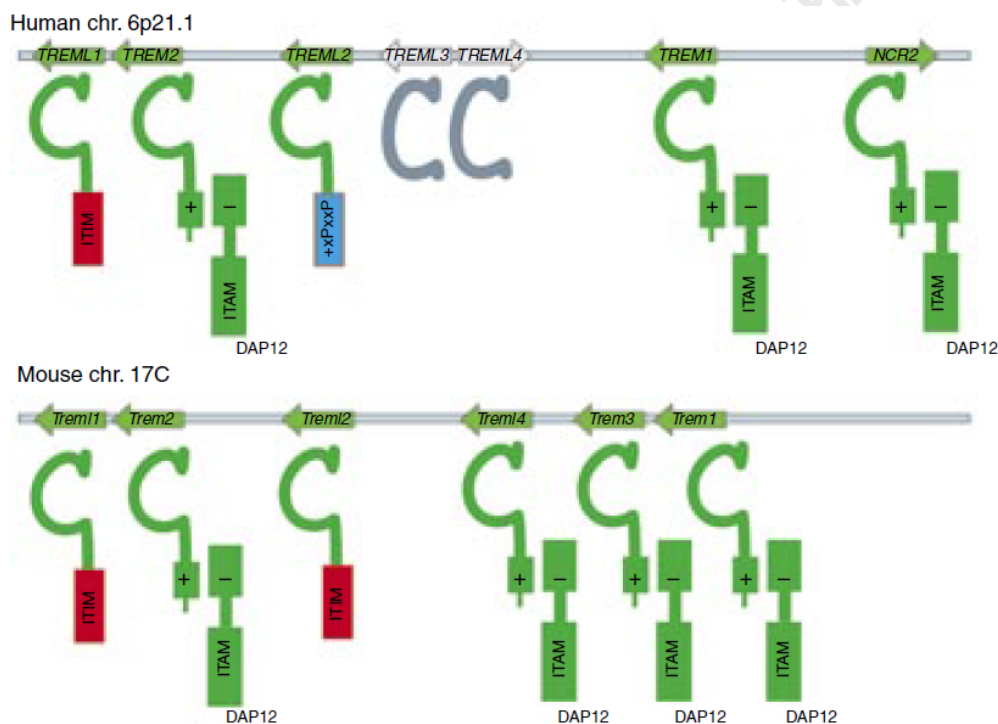


图 1.2 人和小鼠基因簇编码的 TREM 分子

Figure 1.2 Gene structure of TREM-1/TREM2...

人TREM基因簇定位于染色体6p.21.1, 鼠TREM基因簇定位于17号染色体C区, 包括trem1, trem2, trem12, trem1, trem2主要依靠含有ITAM域的DAP12传递信号到胞内, trem12含有SH3结合基序。人基因簇上还包含编码NKp44蛋白的NCR2基因。

注: 摘自Julia Klesney-Tait等, 2006

2.2 可溶性 TREMs

另一个关于 TREM 家族十分有趣的现象是可溶性 TREM 受体家族 (soluable

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库